

原 著

ドジョウの卵から抽出した抗 B レクチンの血液型検査への応用

山下万利子^{1,2)} 南 裕史¹⁾ 坊池 義浩¹⁾ 池田 修¹⁾
西村 千恵¹⁾ 石谷まさ子¹⁾ 能勢 義介¹⁾ 井本しおん¹⁾
三戸 壽¹⁾ 西山 馨²⁾

¹⁾兵庫県赤十字血液センター

²⁾神戸大学医学部保健学科

(平成 14 年 8 月 26 日受付)

(平成 14 年 11 月 14 日受理)

APPLICATION OF A SPECIFIC LECTIN HEMAGGLUTININ ISOLATED FROM LOACH ROE TO ABO BLOOD TYPING

Mariko Yamashita^{1,2)}, Hirofumi Minami¹⁾, Yoshihiro Bouike¹⁾, Osamu Ikeda¹⁾,
Chie Nishimura¹⁾, Masako Ishitani¹⁾, Yoshisuke Nose¹⁾, Shion Imoto¹⁾,
Hisashi Mito¹⁾ and Kaoru Nishiyama²⁾

¹⁾Hyogo Red Cross Blood Center

²⁾Faculty of Health Sciences Kobe University School of Medicine

Homogenate of matured roe of the female loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was absorbed with the stromas of A and O red cells. A lectin could be obtained after centrifugation to remove the stromas. This crude lectin was further purified by column chromatography on DEAE-cellulose (DE-52). Agglutination was carried out by centrifugation after reaction with 5% washed RBC and 22% polymerized bovine albumin.

This crude or partially purified lectin reacted with B and AB red cells but not A, O or acquired B red cells. The subgroups (B_3 , B_m , A_1B_3 , A_2B_3 , A_1B_m , A_1B_x) of red cells could not react. This lectin was therefore defined as B-specific lectin.

Agglutinating activity was inhibited by monosaccharides such as L-rhamnose and L-mannose more effective than by D-galactose, D-fucose, L-arabinose and L-xylose. Other monosaccharides failed to inhibit agglutination. Oligosaccharides possessing a galactose residue as a terminus such as trisaccharide (raffinose) and tetrasaccharide (stachyose) also inhibited agglutination.

This B-specific lectin may be suitable for application to ABO blood typing by a manual or automatic mechanical procedure like A_1 or H lectin.

Key words : loach lectin, blood typing B-specific lectin, rhamnose-type lectin

はじめに

現在までに、細胞表面の糖鎖抗原を特異的に認識できる多数のレクチンが発見され利用されている。なかでも抗 A レクチン、抗 H レクチン等はずでに A、O の各血球に対する反応性を利用した血

液型検査に広く利用されている^{1,2)}。しかし、B 血球を特異的に認識するレクチンは、血液型検査にまだ応用されていない。

榊原ら³⁾はドジョウの卵から精製した抗 B レクチンの各種単糖に対する反応性を検討し、これが

ラムノースに特異的なレクチンであると報告している。アマゴの卵から同様の報告⁴⁾があり、今回の我々のデータと一致している。また植物の種子マユミからメリピオースに特異的な抗 B レクチンの報告がある⁵⁾。

今回、我々は安価で入手が可能なドジョウの卵から抽出精製したレクチンは、凝集反応増強剤を添加することにより B 血球と強く反応すると同時に、B 血球を特異的に凝集させる活性があることを確認した。またこの凝集反応には D-Galactose 残基が重要であることを示唆した。この抗 B 凝集素様物質（抗 B レクチン）は、変異型の判定に非常に有用であることが確認されたので報告する。

材料および方法

1. 材料

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の卵（養殖）

2. Acquired B 血球の調整

2,500rpm 10 分遠心後、A 型血球の沈殿層 1ml に *Clostridium teritum* から抽出した N-deacetylase を 0.1U/ml 加え 37℃ 30 分反応後、生理食塩水で 3 回洗浄して acquired B 血球浮遊液とした。acquired B 血球は再アセチル化の方法を用い抗 B 抗体との反応が減少することで確認した⁶⁾。

3. 粗抗 B レクチンの分離精製

産卵期のドジョウの卵に 5 vol の 1/15M リン酸緩衝食塩液 pH 7.4 溶液（以下 PBS）を加えてヒスコトロン超高速ホモジナイザー NS-60（日音医理科器械製作所）で最高速 1 分間 3 回ホモジネイトし、ガラスウールでろ過した。15,000rpm 25 分 4℃ で冷却遠心し、その上清をガラスウールでろ過し脂質を除去した。この上清 100ml に対して A、O 血球の stroma⁷⁾を各 4ml 加え、4~6℃ で一晩攪拌した。このろ液が B 型血球に特異的であることを凝集活性で確かめた後、60% 飽和硫酸沈殿法で濃縮して PBS に溶解し透析しこれを粗抗 B レクチンとした。

10mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）で平衡化した DEAE-cellulose（DE-52 Whatman 社）カラム（直径 2.5cm 高さ 15cm）に粗抗 B レクチンをアプライし 10mM Tris-HCl 緩衝液で溶出し、さらにカラ

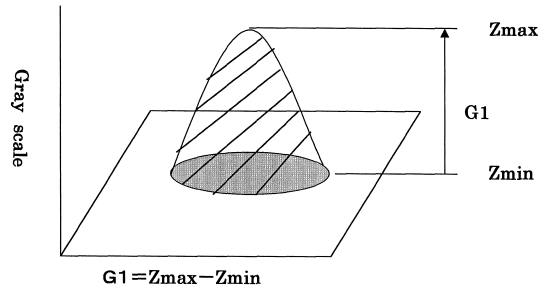


Fig. 1 Characteristic values of B cells agglutinated by B-specific lectin

ムに吸着したレクチン分画は 0.5M NaCl-10mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）で溶出し各分画の凝集価とタンパク質を 280nm の吸光度で測定した。

4. 凝集活性の測定方法

小試験管に A₁, O, B, A₁B 型及び変異型の 5% 血球浮遊液 1 滴、レクチン被験液 1 滴、22% 重合ウシアルブミン液 1 滴を混合し、1,000rpm で 1 分間遠心する。ゆるやかに試験管を振って血球を再浮遊させ、肉眼で凝集の有無を判定した。各種の血球に対する被凝集価の測定は成書に従った⁸⁾。

5. 糖による凝集能の阻害

各糖（L-ラムノース、L-マンノース、スタシオース、ラフィノース、D-ガラクトース、D-フコース、L-アラビノース、L-リキソース、D-グルコース、D-マンノース、D-アラビノース）を PBS に溶解し、2 倍希釈系列を作った。これに精製抗 B レクチンを等量混和し、30 分間ブレインキュベーションした。さらに B 血球を加えた後、凝集活性の有無を確認し抗 B レクチンの赤血球凝集能を阻害する最小の糖濃度を求めた。

6. 血液型自動分析機（トレマック GR：メディカテック製）への応用

(1) 抗 B レクチンを、希釈液（生理食塩水：22% 重合ウシアルブミン：10% デキストラン = 70：10：2）で 2~3 倍に希釈して使用する。

(2) 血液型自動分析機の条件設定

約 4% 血球浮遊液 25μl に希釈した抗 B レクチン溶液 30μl を加え、反応時間は 125 秒、遠心時間

Table 1 Titration of loach lectin for agglutination

Crude lectin											
Red cells	Titer										
	× 1	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1,024
B	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	2 +	2 +	1 +		
A ₁ B	4 +	3 +	3 +	2 +	2 +	1 +	1 +				
A ₁											
O											

Partially purified lectin											
Red cells	Titer										
	× 1	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1,024
B	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	2 +	1 +				
A ₁ B	3 +	2 +	1 +	W +							
A ₁											
O											

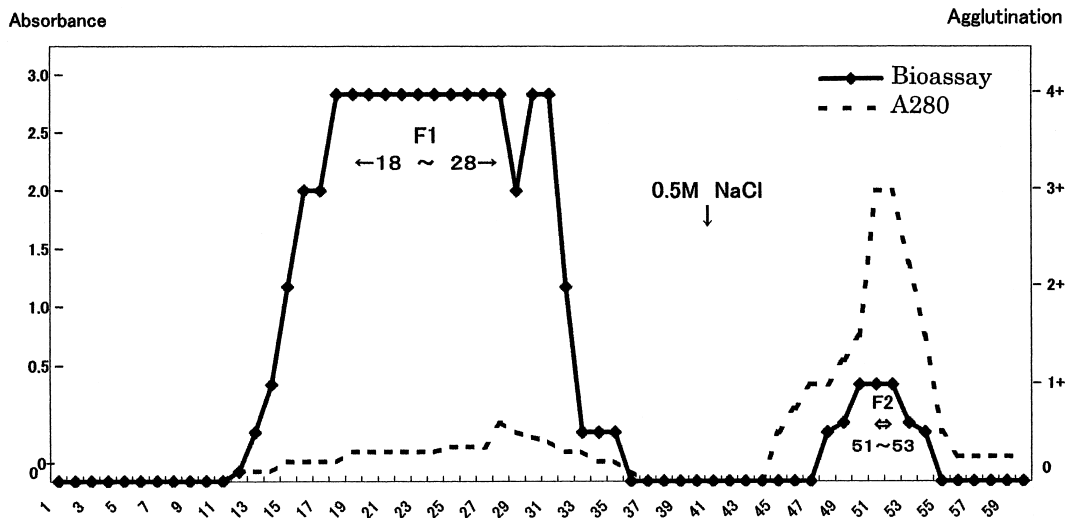


Fig. 2 DE-52 column chromatography of crude B-lectin isolated from the roe of the female loach

は 1,050rpm 35 秒とした。

凝集塊の高さ(以下 $G1 = Z_{max} - Z_{min}$: Fig. 1)を画像処理装置で計算し、G1 の値が 0 ~ 50 は陰性域、51 から 80 は保留域、81 ~ 160 は陽性域と設定し判定した。

結 果

1. 粗抗 B レクチンの特異性

試験管法にて A₁, O, B, A₁B 血球と粗抗 B レクチンの反応性は A₁, O 血球にはまったく凝集が

認められず、目的としている B と A₁B 血球にのみ特異的に強い凝集が認められた。これは、レクチンによる非特異的の反応が stroma との吸収反応で完全に除去されたためである。粗抗 B レクチンの凝集素価は B 血球に対して 256 倍で、A₁B 血球に対しては 64 倍であった (Table 1)。

2. 粗抗 B レクチンの精製

DE-52 カラムで 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) を用いて溶出した溶出液は、F1 (Fr18 ~ 28) に B

Table 2 Inhibition of agglutination by sugars

Sugar	Structure	Minimum conc (mM) required for complete inhibition
L-Rhamnose		0.1
L-Mannose		0.2
Stachyose	D-Gal α 1,6 D-Gal α 1,6 D-Glc α 1,2 β D-Fru	1.0
Raffinose	D-Gal α 1,6 D-Galc α 1,2 β D-Fru	2.0
D-Galactose		4.0
D-Fucose		10.0
L-Arabinose		18.8
L-Lyxose		30.0
D-Glucose		800
D-Mannose		> 1,600
D-Arabinose		> 2,400

Table 3 Activity of lectin on O, B and acquired B cells

Lectin	Red cell		
	O	B	Acquired B
Crude lectin	0	4 +	0
Partially purified lectin	0	4 +	0

血球と強い凝集(4+)が認められ、この分画(F1)を精製抗Bレクチンとした。0.5M-NaClを添加して溶出されるF2(Fr51~53)には弱い凝集(1+)が確認されたが、全レクチン活性の10%以下にすぎなかった(Fig.2)。

精製抗Bレクチンの凝集素価には顕著な低下は認められなかった(Table1)。

3. 糖による凝集能の阻害

糖添加による凝集の阻害については、単糖としてL-ラムノース、L-マンノース、D-ガラクトースに強い凝集阻害を示した。

ガラクトース残基を末端にもつ三糖のD-ラフィノース、四糖のスタキオースも同程度の濃度で阻害した。五炭糖のL-アラビノース、L-リキソースはL-マンノース、D-ガラクトースとOHの配置が同様なため過不足のない阻害活性を示した。最も低い濃度で凝集を阻害した糖はL-ラムノースであった。また同じマンノースであってもD-マンノースは阻害しなかった(Table2)。

4. Acquired B との反応性の確認

ガラクトースのC2位の誘導体であるN-アセチルガラクトサミンのNHCOCH₃基が*Clostridium teritum*から抽出したN-deacetylaseによってNH₂基に置換されてガラクトサミンに変化したacquired B血球⁹⁾とは粗抗Bレクチン、精製抗Bレクチン共に反応しなかった(Table3)。

5. B型の変異型との反応性

B, B₃, B_m, A₁B, A₁B₃, A₂B₃, A₁B_m, A₁B_xの血球と抗血清(Anti A, Anti B, Anti A, B)との反応は典型的な凝集パターンを示した。一方、抗BレクチンはB, A₁B型の血球と強い凝集が認められた。しかし、変異型のB₃, B_m, A₁B₃, A₂B₃, A₁B_m, A₁B_xの各血球と抗Bレクチンとは凝集が確認できなかった(Table4)。

6. 血液型自動分析機へ応用

粗抗BレクチンとA₁, O, B, A₁B血球との反応性をG1の平均値で確認するとA₁血球では15±13, O型血球では7±4, B血球では123±7, A₁B血球では91±13であった。精製レクチンについても同様でB, A₁B血球は陽性域(81~160)にA₁, O血球は陰性域(0~50)に判定できた。血液型自動分析機への抗Bレクチンの適用の有用性を示すことができた(Table5)。

考 察

今回、ドジョウの卵から抽出した抗Bレクチンは、A₁, O血球とは全く反応せずB, A₁B血球に強い凝集活性高い凝集素価を示した。またB血球がA₁B血球より、粗抗Bレクチン、精製抗Bレクチン共に強い凝集活性高い凝集素価を認めたことは、B抗原量の量的差¹⁰⁾を認識していることが示唆された。B, A₁B血球への凝集素価は、粗抗Bレクチンの方が精製抗Bレクチンより4倍から8倍高いが実用上には問題ない(Table1)。

榊原ら³⁾は、凝集反応増強剤を使用していないが、我々は凝集反応増強剤として22%の重合アルブミンを添加することにより、試験管法(1,000rpm, 1分間)で強い凝集活性、高い凝集素価を確認することができた。凝集反応増強剤として重合ウシアルブミンを添加することは、重合アルブミンによって赤血球のζ電位が下げられたためであると考えられる。本法により抗Bレクチンが、抗Aレクチン、抗Hレクチンと同様に試験管法に適用することができたことは、血液型検査に非常に実用的であると思われる。

抗Bレクチンがacquired B(ガラクトサミン)血球とB血球(ガラクトース)とを容易に判別できること、さらに変異型のB₃, B_m, A₁B₃, A₂B₃, A₁B_m, A₁B_xの血球は抗B抗体と弱く凝集するが、抗Bレクチンとは全く凝集しないことが確認された。

これらのことから血液型判定時に、血球側と血清側の検査結果が不一致を示した場合、抗Bレクチンに22%重合ウシアルブミンを添加する試験管法は、簡便で正確な結果を得られるので非常に有用である。

Table 4 Serological characteristics of some variants of B and AB

Red cells	Reactions with						
	Antibody			Lectins			
	Anti-A	Anti-B	Anti-A, B	Anti A	Anti B		Anti H
(Crude)					(Partial purified)		
B	0	4+	4+	0	4+	4+	4+
B ₃	0	+ mf	+ mf	0	0	0	4+
B _m	0	0	0	0	0	0	4+
A ₁ B	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+
A ₂ B ₃	4+	+ mf	4+	0	0	0	4+
A ₁ B ₃	4+	+ mf	4+	4+	0	0	4+
A ₁ B _m	4+	0	4+	4+	0	0	4+
A ₁ B _x	4+	0/w+	4+	4+	0	0	4+

mf : mixed field

Table 5 GI values of blood groups

Lectin	Crude lectin		Partially purified lectin	
	N	X ± SD	N	X ± SD
B	114	123 ± 7	55	114 ± 7
A ₁ B	114	91 ± 13	40	118 ± 4
A ₁	170	15 ± 13	110	11 ± 10
O	141	7 ± 4	74	10 ± 10

また、血液型自動分析機にも抗 A レクチンと同様抗 B レクチンが適用でき、今後の輸血検査における血液型判定には有用であると思われる。

今回ドジョウの卵からの抗 B レクチンはガラクトースを末端にもつ三糖、四糖にも特異性が認められた。従って、これらは糖の C2 位と C4 位の水酸基の立体配置がレクチンとの結合に重要であることが推測された。L-ラムノース、L-マンノース、D-ガラクトースなどに強く凝集能が阻害され、D-グルコースにはほとんど阻害されなかった (Table 2)。

さらに、抗 B レクチンが変異型の B 抗原の量的変化を認識しているのか、また、糖鎖抗原の糖の違いによるものかどうかは今後の課題である。

謝辞：抗 B レクチンの精製と糖に対する特異性に関する実験にご協力いただきました神戸大学医学部保健学科の山口静香 (平成 10 年度卒)、井上しのぶ、平井ひかり (平成 11 年度卒) の各氏に深謝致します。

文 献

- 1) Boyd, W.C., Shapleigh, E. : Antigenic relations of blood group antigens as suggested by test with lectins. J. Immunol, 73 : 226 231, 1954.
- 2) Morgan, W.T.J., Watkins, W.M. : The inhibitions of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. Br. J. Exp. Path., 8 : 94 103, 1953.
- 3) 榑原房夫, 高柳義一, 川内廣明 : *Misgurnus anguillicaudatus* 卵の L-ラムノース結合性レクチンについて. 薬学雑誌, 101, 918 925, 1981.
- 4) Yamamoto, S., Sasaki, I. : Composition and Immunochemical Properties of Glycoproteins with anti-B Agglutinin Activity Isolated from *Euryonymus sieboldiana* Seeds. J. Immunobiotics, 8 : 271 279, 1981.
- 5) Ozaki, H., Ohwaki, M., Fukada, T. : Studies on Lectins of Amago (*Oncorhynchus rhodurus*) Amago Ova Lectin and its Receptor on Homologous Macrophages. Developmental and Comparative Immunology, 7 : 77 87, 1983.
- 6) 日本臨床衛生検査技師会 : 後天性 B 型血球の再アセチル化. 輸血検査の実際, 39, 1996.
- 7) Waterman, M.R. : Spectral characterization of human hemoglobin and its derivatives. Methods in Enzymology, 52 : 456 463, 1978.
- 8) 福岡良男 : 臨床免疫学. 臨床検査講座, 23 : 387, 1989.
- 9) Geoff, D. : Human Blood Groups, Blackwell Scientific Publications, London : 62 67, 1995.
- 10) Issitt, P.D. : Applied Blood Group Serology, Third Edition : Montgomery Scientific Publications, Miami Florida USA : 132 168, 1990.